

2011 年度 修士論文要旨

DPPC/Ceramide 混合脂質二重層膜における

相分離現象の解析

関西学院大学大学院理工学研究科

物理学専攻 加藤研究室 野口 勝弘

スフィンゴ脂質の一種であるセラミド(Ceramide)は、微量でも膜融合やアポトーシスなど、様々な生体機能に影響を及ぼすため、多くの研究者から注目を集めてきた。また、生体膜中でスフィンゴミエリン(SM)やコレステロール等と共に脂質ラフトと呼ばれる流動的な領域から分離された硬い領域(L_o相)を形成して重要な生体機能を担っていることが知られている。セラミドが他の脂質とどのような相互作用をするかを考えるために、人工リン脂質二重層膜にセラミドを添加することで引き起こされる Ceramide(Cer)-rich 領域と Cer-poor 領域の相分離現象が調べられてきた。Cer-rich 領域は脂質ラフトと同様流動相と共存するが、L_o相よりも硬いゲル相状態にあると考えられている。Cer-rich 領域における脂質組成については、リン脂質:セラミド=2:1 という組成が Busto らによって提案されたが、組成のセラミド濃度依存性など、より詳細に解析した研究はこれまで行われてこなかった。

本研究では、代表的なリン脂質であるジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)とパルミトイルスフィンゴシン(C16-ceramide)、またはミリストイルスフィンゴシン(C14-ceramide)の2成分系脂質膜で起こる相分離現象を、Cer-rich 領域の詳細な脂質組成に着目して解析した。実験では、示差走査熱量測定(DSC)、分光光度計による濁度測定、凍結割断電子顕微鏡観察を行った。DPPCにC16-ceramideを添加すると、鎖融解転移(主転移)に伴う吸熱ピークの高温側にブロードな肩が現れ、Cer-poor相とCer-rich相に相分離していることが示唆された。転移開始温度がセラミド濃度に依存せず一定であることやCer-poor領域と考えられる膜表面に現れるリップル構造の周期がPure DPPC膜のものとはほぼ同じであったことから、Cer-poor領域に含まれるセラミドは極微量であることが示唆された。そこでCer-poor領域をPure DPPC領域と仮定して、その主転移エンタルピーのセラミド濃度依存性を解析した結果、Cer-rich領域には、約15 mol%のセラミドが含まれることが推測された。しかしDPPC/15 mol% C16-ceramide混合脂質二重層膜でもCer-poor相の主転移ピークは消失せず、30 mol%まで残っていた。また、界面活性剤に対する可溶性が流動相とゲル相で異なることを利用してCer-rich領域を抽出する実験では、界面活性剤不溶性画分として得られた脂質膜には約30mol%のセラミドが含まれていた。これらの結果は、調製された試料が非平衡状態にあることを示唆している。この非平衡現象の原因として、(1)セラミド濃度の増加に伴って、Cer-rich領域内のセラミド濃度が、15 mol%から30 mol%に変わる可能性、(2)セラミド15 mol%の領域は準安定相で、30 mol%が安定相である可能性、(3)ベシクル毎に

セラミド濃度が不均一である可能性の 3 つの可能性について検討した。平衡への緩和時間を考慮した実験を行った結果に基づき、(1)の可能性に加えて、セラミド 30 mol%領域内の分子拡散が遅いと考えることによって、熱測定の結果が説明できることを示した。このように、本研究により DPPC/セラミド 2 成分系は従来考えられていたよりも複雑な相挙動を示すことが明らかとなった。